

09/787714

203 Rec'd PCT/PTO 21 MAR 2001

PLA0017

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:

Valérie DESCAMPS, et al.

Group Art Unit: To Be Assigned

Serial No.: To Be Assigned

Examiner: To Be Assigned

Filed: Herewith

For: **ENDOFUCANASES AND METHOD USING SAME FOR PREPARING  
FUCO-OLIGOSACCHARIDES FROM FUCANES, BACTERIUM  
PRODUCING ENDOFUCANASES AND USES OF FUCO-  
OLIGOSACCHARIDES FOR PLANT PROTECTION**

**CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119**

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior application filed in the following foreign country is hereby requested and the right of the priority provided under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed: **French Patent Application Serial No. 98 11756 filed September 21, 1998.**

Respectfully submitted,

Valérie DESCAMPS, et al.

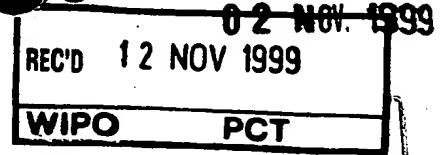
Dated: 3/21/01

By: George T. Marcou #44,433  
George T. Marcou, Registration No. 33,014

KILPATRICK STOCKTON LLP  
Suite 800  
700 Thirteenth Street, N.W.  
Washington, D.C. 20005  
(202) 508-5800

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---



FR 99/2243

4

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

**19 OCT. 1999**

Fait à Paris, le .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**Martine PLANCHE**

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI DATE DE REMISE DES PIÈCES <b>21 SEP. 1998</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL <b>98 11756 -</b> DÉPARTEMENT DE DÉPÔT <b>PS</b> DATE DE DÉPÔT <b>21.09.98</b>		1 <b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  Cabinet PLASSERAUD 84 rue d'Amsterdam 75440 PARIS CEDEX 09									
2 <b>DEMANDE</b> Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°		n° du pouvoir permanent : <b>GK/FCO/BFF980214</b> références du correspondant : <b>GK/FCO/BFF980214</b> téléphone :									
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non											
Titre de l'invention (200 caractères maximum) <b>""Fuco-oligosaccharides, enzyme pour leur préparation à partir des fucanes, bactérie productrice de l'enzyme et applications des fuco-oligosaccharides à la protection des plantes"</b>											
3 <b>DEMANDEUR (S)</b> n° SIREN : . . . . . code APE-NAF : . . . . . Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination <b>Laboratoires GOËMAR S.A.</b>		Forme juridique <b>Société anonyme</b>									
Nationalité (s) <b>française</b>		Adresse (s) complète (s) <b>ZAC de la Madeleine 35400 SAINT MALO</b>									
Pays <b>FRANCE</b>		En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>									
4 <b>INVENTEUR (S)</b> Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
5 <b>RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission											
6 <b>DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 <b>DIVISIONS</b> antérieures à la présente demande n° : date : n° : date :											
8 <b>SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) <b>G. KOCH (N° 92-1128)</b>		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI									

**DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR**

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

**DEPARTEMENT DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

**98 11756**

**TITRE DE L'INVENTION :**

« Fuco-oligosaccharides, enzyme pour leur préparation à partir des fucanes,  
bactérie productrice de l'enzyme et applications des fuco-oligosaccharides à la  
protection des plantes »

**LE(S) SOUSSIGNÉ(S)** **La Demanderesse**  
**Laboratoires GOËMAR S.A.**  
ayant pour mandataire:

**Cabinet PLASSERAUD**  
**84, rue d'Amsterdam**  
**75440 PARIS CEDEX 09**

**DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- |  |  |
|--|--|
| 1) <b>DESCAMPS Valérie</b><br><b>22 rue Yan d'Argent</b><br><b>29680 ROSCOFF</b>     | 5) <b>FRITIG Bernard</b><br><b>6 rue Hohwald</b><br><b>67460 SOUFFELWEYERSHEIM</b>       |
| 2) <b>KLARSZINSKY Olivier</b><br><b>13 rue des Vosges</b><br><b>68740 FESSENHEIM</b> | 6) <b>JOUBERT Jean-Marie</b><br><b>13 rue Gesril Du Papeu</b><br><b>35400 SAINT MALO</b> |
| 3) <b>BARBEYRON Tristan</b><br><b>30 rue de la Garenne</b><br><b>29233 CLEDER</b>    | 7) <b>PLESSE Bertrand</b><br><b>23 rue Saint Erhard</b><br><b>67000 STRASBOURG</b>       |
| 4) <b>CLOAREC Bernard</b><br><b>Penn ar Feunteun</b><br><b>29420 PLOUENAN</b>        | 8) <b>YVIN Jean-Claude</b><br><b>3 rue Gabriel Desgrés</b><br><b>35400 SAINT MALO</b>    |

**NOTA :** A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS, le 8 octobre 1999

  
G. KOCH (N° 92-1128)

# DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDECATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
8, 18			α	22-02-99	18 MAI 1999 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

**FUCO-OLIGOSACCHARIDES, ENZYME POUR LEUR PRÉPARATION  
À PARTIR DES FUCANES, BACTÉRIE PRODUCTRICE DE L'ENZYME  
ET APPLICATIONS DES FUCO-OLIGOSACCHARIDES À  
LA PROTECTION DES PLANTES**

5

L'invention a pour objet des fuco-oligosaccharides particuliers obtenus à partir des fucanes.

10

Elle a également pour objet une enzyme propre à la préparation desdits fuco-oligosaccharides par hydrolyse enzymatique des fucanes; elle vise de plus une bactérie productrice de l'enzyme et la préparation de cette enzyme à partir de la bactérie.

15

Elle a enfin pour objet l'application de ces fuco-oligosaccharides à la protection des plantes.

Les fucanes sont des polysaccharides à base de  $\alpha$ -L-fucose.

Ils peuvent être extraits de la paroi des algues brunes.

20

Ils peuvent également être extraits des échinodermes.

On a déjà préparé, par hydrolyse acide ou radicalaire, des fractions oligosaccharidiques à partir des fucanes.

25

Diverses activités biologiques ont été étudiées tant en rapport avec les fucanes qu'en rapport avec certaines fractions de plus faible poids moléculaire.

L'invention vise des fuco-oligosaccharides particuliers, une enzyme pour leur préparation et leurs applications dans le domaine de la protection des plantes.

30

Les fuco-oligosaccharides conformes à l'invention sont sulfatés et ont un degré de polymérisation de 4 à 100, de préférence de 4 à 20 unités  $\alpha$ -L fucose; deux d'entre eux sont caractérisés par les formules développées I et II représentées à la figure 1.

35

Conformément à l'invention, ils sont préparés par



hydrolyse enzymatique à partir des fucanes en faisant agir sur ceux-ci une enzyme que la Société Demanderesse a eu le mérite d'isoler.

5 Cette enzyme est secrétée par une souche bactérienne à activité fucanolytique que la Société Demanderesse a obtenue à partir des boues industrielles utilisées pour le traitement des effluents, riches en fucanes sulfatés, d'une usine d'extraction d'alginates.

Pour ce faire, elle a procédé comme suit.

10 Des boues, prélevées dans les bassins d'oxygénation et de décantation d'une station d'épuration située en aval d'une usine d'extraction d'alginates, sont utilisées comme inoculum d'un milieu pauvre à base d'eau de mer filtrée contenant 2 g/l de fucane.

15 En travaillant sur des parties aliquotes du milieu de culture ainsi constitué, on effectue chaque jour le test dit "à l'albumine sérique bovine" (ou BSA).

20 Le principe de ce test est fondé sur le fait que les polysaccharides anioniques s'associent, en milieu acide, avec l'albumine chargée positivement, provoquant ainsi une précipitation de l'ensemble des complexes formés.

25 Au contraire, les oligosaccharides et les oses ne sont pas précipités ou floculés car ils sont de trop faible poids moléculaire pour donner lieu à la formation d'un complexe insoluble.

En vue du test BSA, on introduit 600 µl du surnageant de culture dans un microtube de 1 ml et on centrifuge.

30 Le surnageant, à savoir 500 µl, est transféré dans un autre tube et mélangé à 2 ml de solution de BSA acide constituée par 3,26 g d'acétate de sodium, 4,56 ml d'acide acétique glacial et 1 g de BSA dans 1 l d'eau distillée, le pH étant de 3,72 à 3,78.

35 On traite parallèlement un témoin qui est constitué par 500 µl de surnageant de culture sans inoculum.

Compte tenu des explications qui précèdent, la formation d'un trouble identique à celui qui se produit dans le témoin indique qu'il n'y a pas eu de dégradation du polymère; par contre, dans le cas où le trouble est moindre ou inexistant, on conclut à la présence, dans la culture bactérienne, d'une activité enzymatique spécifique du fucane.

Le test s'est avéré positif au bout de 7 jours d'incubation du fucane en présence de l'inoculum décrit plus haut.

Une partie aliquote du milieu de culture correspondant est alors étalée sur boîte de Pétri contenant le milieu connu sous l'appellation Zobell-Fucane, qui est constitué par le milieu Zobell (1941) additionné de fucane à 2 g/l et solidifié par de l'agar à 15 g/l.

La composition du milieu Zobell [Zobell CE(1941) "Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes" paru dans *J. Mar. Res.*, 4 : 41-75] est comme suit:

20	Bacto-peptone Difco	5,0 g
	Extrait de levure Difco	1,0 g
	Eau de mer filtrée	800 ml
	Eau distillée	q.s.p. 1 l

On constate la formation dans la boîte de Pétri d'un certain nombre de colonies différentes les unes des autres et qui correspondent à autant de souches.

Chacune de ces colonies, autrement dit chacune des souches, est isolée à partir de ce milieu et introduite dans un milieu liquide Zobell-Fucane constitué par 1/2 volume de Zobell et 1/2 volume d'une solution de fucane à 4 g/l dans de l'eau de mer filtrée.

Sur chacune des souches ainsi isolées et introduites dans le milieu Zobell-Fucane, on effectue le test BSA pour détecter les souches fucanolytiques.

Lorsque le test est positif, la souche est repiquée

sur milieu Zobell-Fucane pour vérifier qu'elle continue à hydrolyser les fucanes du nouveau milieu; si tel est le cas, cela signifie que tout le dispositif génétique nécessaire à la production de la fucanase est mis en place; on dit alors  
5 que la souche est induite par le substrat; autrement dit, la présence de fucanes dans le milieu induit la production de l'enzyme par la souche. En raison de cet état de choses, le test BSA est de nouveau effectué sur la nouvelle culture.

En procédant ainsi, on a isolé une souche qui a été  
10 dénommée SW5 et qui donne un test BSA positif au bout de 3 à 4 jours lorsqu'elle est cultivée sur milieu Zobell-Fucane.

La susdite souche SW5, sélectionnée de la manière venant d'être décrite, a été déposée sous le n° 12171 dans la collection DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) dont l'adresse est la suivante:  
15 Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Allemagne.

La souche est en bâtonnet Gram négatif, aérobie stricte, chimioorganotrophe et hétérotrophe. Au bout de trois jours de culture, les colonies sur milieu Zobell-Fucane solide sont petites (1 mm de diamètre) et pigmentées  
20 en orange. La souche SW5 nécessite de l'eau de mer pour sa croissance, sa température optimale de croissance se situant autour de 18-20°C. Aucune croissance n'est constatée en dessous de 15°C et au-dessus de 25°C. D'autres  
25 caractéristiques phénotypiques de la souche SW5 sont montrées dans le tableau I ci-après.

**TABEAU I****Caractères physiologiques et biologiques de la souche SW5**

	Caractères positifs	Caractères négatifs	Caractères négatifs (suite)
5	catalase	oxydase	$\alpha$ -hydroxybutyrate
	$\alpha$ -cyclodextrine	flexirubine	$\beta$ -hydroxybutyrate
	dextrine	réduction des nitrates	$\gamma$ -hydroxybutyrate
	glycogène	formation d'indole	p-hydroxyphénylacétate
	cellobiose	fermentation arginine dihydrol	itaconate
10	D-fructose	uréase	$\alpha$ -kétobutyrate
	L-fucose	tween 40	$\alpha$ -kétoglutarate
	D-galactose	tween 80	$\alpha$ -kétovalérate
	gentobiose	N-acétyl-D-galactosamine	malonate
	$\alpha$ -D-glucose	N-acétyl-D-glucosamine	propionate
15	$\alpha$ -D-lactose	adonitol	quinat
	maltose	L-arabinose	D-saccharate
	D-mannose	D-arabitol	sébacate
	$\beta$ -méthyl-D-glucoside	érythritol	succinate
	turanose	m-inositol	bromosuccinate
20	mono-méthyl-succinate	lactulose	succinamate
	D-galacturonate	D-mannitol	glucuronamate
	D-glucuronate	D-mélibiose	alininamide
	D,L-lactate	D-psicose	D-alanine
	L-alanine	D-raffinose	L-histidine
25	L-alanyl-glycine	L-rhamnose	D,L-carnitine
	L-asparagine	D-sorbitol	$\gamma$ -aminobutyrate
	aspartate	sucrose	inosine
	L-glutamate	D-tréhalose	uridine
	glycyl-L-aspartate	xylitol	thymidine
30	glycyl-L-glutamate	méthyl pyruvate	phényléthylamine
	L-ornithine	acétate	putrescine
	L-proline	cis-aconitate	2-aminoéthanol
	L-thréonine	citrate	2,3-butanediol
	urocanate	formate	glycérol
35	glucose-1-phosphate	D-galactanate lactone	D,L- $\alpha$ -glycérol phosphate
	glucose-6-phosphate	D-gluconate	
		D-glucosamine	

40 L'identité, à l'échelon de l'espèce, de la souche SW5 a été établie par la séquence nucléotidique ID No.1 du gène codant pour l'ARN 16S.

45 La comparaison de la séquence de ce gène avec les gènes homologues issus de bactéries du groupe CFB (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*) a permis de construire un arbre phylogénétique dont il résulte que la

souche appartient à la famille des *Flavobacteriaceae* (Bernardet et al, 1996, International Journal of Systematic Bacteriology, Jan: 128-148) et qu'elle est proche de *Gelidibacter algens* (Bowman et al, 1997, International Journal of Systematic Bacteriology, July: 670-677), une souche isolée des glaces de l'Antarctique.

Il s'ensuit que le procédé conforme à l'invention pour la préparation des susdits fuco-oligosaccharides est caractérisé par le fait que l'on soumet un substrat constitué par une matière première à base de fucanes à une hydrolyse enzymatique à l'aide d'une enzyme fucanolytique susceptible d'être obtenue à partir d'une souche bactérienne déposée sous le N° 12171 dans la collection DSMZ.

Les fuco-oligosaccharides conformes à l'invention sont également caractérisés par le fait qu'ils sont susceptibles d'être préparés par mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention.

La bactérie SW5 secrète dans son milieu de culture des quantités significatives d'activité fucanase, pouvant être utilisées à température ambiante, en milieu tamponné à pH 7,5, voire dans l'eau.

La préparation du substrat, autrement dit des fucanes qui doivent être soumis à l'action de l'activité enzymatique, est effectuée comme suit.

On soumet 150 kg d'algue brune *Pelvetia canaliculata* à un broyage en vue d'obtenir des fragments de 2,5 à 3 mm, en utilisant un dispositif désigné par Comitrol 2100 et commercialisé par la Société Urschel.

Ces fragments sont soumis à une extraction par 800 l d'acide chlorhydrique 0,01 N contenant 4% en poids de  $\text{CaCl}_2$  en maintenant une agitation pendant 3 heures à 70°C.

La suspension de fragments d'algue ainsi traitée est décantée pendant 2 h.30 et le rétentat obtenu est centrifugé; le surnageant de l'opération de centrifugation est soumis à une ultrafiltration tangentielle sur des

membranes de 50 kDa. Le rétentat obtenu à l'issue de cette ultrafiltration tangentielle est atomisé à l'aide d'un dispositif désigné par l'appellation Miro et commercialisé par la Société Minor Production.

5 Le résultat de cette atomisation est une poudre constituée majoritairement par des fucanes.

10 Cette poudre est soumise à une purification supplémentaire par remise en solution, centrifugation, précipitation du surnageant à l'éthanol, remise en solution du précipité dans l'eau et ultrafiltration de la solution aqueuse sur des membranes de 30000 Da.

Le rétentat issu de cette ultrafiltration est soumis à une lyophilisation et constitue le substrat recherché; on le désigne par FS28EtOH.

15 Ce substrat, autrement dit cette poudre de fucanes, est soumis à l'activité enzymatique obtenue à partir de la bactérie SW5.

20 Pour ce faire, on prépare une solution à 1 g/l de substrat FS28EtOH dans du tampon Tris (20 mM, pH 7,5); on prélève 50 µl de cette solution et on la mélange à 10 µl de la fraction protéique à tester qui contient l'activité enzymatique obtenue à partir de la bactérie SW5.

Le mélange est maintenu pendant 1 heure à température ambiante.

25 L'hydrolysats final contient le mélange de fuco-oligosaccharides conformes à l'invention.

30 Cet hydrolysats est soumis à une électrophorèse en vue de mettre en évidence de façon qualitative la présence de fractions oligosaccharidiques; cette électrophorèse est effectuée sur gel de polyacrylamide en utilisant la technique dite C-PAGE décrite par Zablackis E. et Perez J. (1990) dans l'article intitulé "A partially pyruvated carrageenan from Hawaiian *Grateloupia filicina* (Cryptonemiales, Rhodophyta) paru dans "Bot. Mar." 33: 273-276.

35 Les profils de dégradation des fucanes obtenus à

l'aide de l'enzyme produite par la bactérie SW5 montrent que l'activité enzymatique de la souche en question est de type endolytique; il a été remarqué au cours des essais que les fucanes présentent des éléments de structure semblables  
5 quelle que soit l'algue brune dont ils sont extraits.

L'activité endo-fucanase de la souche SW5 a été purifiée à l'homogénéité électrophorétique; on a déterminé que la protéine en question a une masse moléculaire d'environ 105 kDa.

10 Trois peptides internes ont alors été micro-séquencés.

On a ainsi obtenu les microséquences ID No.2, ID No.3 et ID No.4.

15 La purification de l'activité endo-fucanase dont il a été question plus haut, a été effectuée à l'aide d'un système commercialisé sous l'appellation FPLC® par la Société Pharmacia; ce système a été placé à 4°C.

Après cinq jours de culture de la souche SW5 dans 6 l de milieu Zobell-Fucane, on procède à une micro-  
20 filtration sur un dispositif du type Pellicon de la Société Millipore équipé d'une cassette de 0,45 µm (Millipore) puis à une ultrafiltration sur une cassette PTGC de 30 000 Da.

Pour le fractionnement des protéines, on procède de la façon suivante:

25 Pour le premier fractionnement de 0 à 40%, on ajoute à la solution protéique du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 242 g/l petit à petit et sous agitation lente à 4°C. Lorsque tout le sulfate d'ammonium est dissous, la solution est centrifugée; le culot, qui représente la fraction entre 0 et 40% n'est pas  
30 conservé tandis que le surnageant est soumis à un nouveau fractionnement de 40 à 60%. Ce fractionnement est réalisé par addition de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 130 g/l petit à petit et sous agitation lente à 4°C. Lorsque tout le solide est dissous, la solution est centrifugée; le culot, qui représente la  
35 fraction protéique entre 40 et 60% de saturation du sulfate

d'ammonium, est conservé et resolubilisé dans le tampon Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM.

La fraction entre 40 et 60% de saturation du sulfate d'ammonium est diluée 20 fois dans du tampon Tris 20 mM pH 7,5 et resaturée à 40% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

L'échantillon ainsi obtenu est injecté sur une colonne de chromatographie d'interaction hydrophobe à base de Phenyl Sepharose CL4B Pharmacia à raison de 1 ml/min.

La colonne est préalablement équilibrée avec du tampon Tris pH 7,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 40%. Le gradient s'effectue par diminution de la concentration en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 1,8 M (40%) à 0 M dans du tampon Tris en 3 volumes de colonne, puis par 2 volumes de tampon sans (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Chaque fraction protéique est utilisée pour hydrolyser le fucane FS28EtOH. L'hydrolysat est préparé comme décrit précédemment par ajout de ladite fraction à une solution de fucane à 1 g/l dans du tampon Tris 20 mM pH 7,5 contenant des sels. L'hydrolysat est alors testé par la technique C-PAGE. Les fractions dites "positives sur C-PAGE" sont celles qui génèrent un profil électrophorétique contenant des fractions d'oligo-fucosaccharides.

Les fractions qui génèrent un profil de dégradation positif sur gel de polyacrylamide sont rassemblées et diluées 5 fois dans du tampon Tris 20 mM pH 7,5; NaCl 5 mM avant d'être injectées sur une colonne de chromatographie d'échange d'anions chargée en DEAE Sepharose CL6B commercialisé par la Société Pharmacia.

Les protéines sont éluées par un gradient de NaCl de 5 mM à 1 M en 3 volumes de colonne, à 1 ml/min.

Ces fractions sont ensuite injectées à raison de 100 µl sur une colonne de filtration, chargée de gel Superdex 200 commercialisé par la Société Pharmacia et préalablement équilibrée à raison de 0,5 ml/min dans du tampon phosphate de sodium 50 mM pH 7,0; NaCl 150 mM.

La fraction active, identifiée par la technique C-



PAGE, est recueillie et la pureté de la protéine est déterminée sur un gel SDS à 12,5% en utilisant le dispositif Phast-System® de la Société Pharmacia. Les marqueurs moléculaires utilisés sont les standards de 14,5 à 200 kDa commercialisés sous l'appellation "broad-range" par la Société Biorad.

Pour la préparation des fuco-oligosaccharides, on peut avoir recours à plusieurs méthodes dont deux sont décrites ci-après.

Dans une première méthode, on laisse agir l'enzyme jusqu'à consommation complète du substrat; on incube pendant 24 heures un fucoïdane de *Pelvetia canaliculata* en présence de l'enzyme partiellement purifiée, puis on ultrafiltre les produits d'hydrolyse sur membrane de 500 Da. On obtient ainsi une fraction désignée par I27.

Du point de vue pratique, on hydrolyse un fucane extrait de *Pelvetia canaliculata* (fraction FS28EtOH) à la température ambiante pendant 24 heures, en ajoutant à 1 litre de substrat d'une concentration de 5 g/l dans le tampon Tris 20 mM pH 7,5; NaCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 5 mM, une quantité de 30 ml de précipité d'enzyme au sulfate d'ammonium 40-60% (3,02 mg de protéines).

L'hydrolysate ainsi obtenu est complété par de l'eau distillée jusqu'à 20 l, puis ultrafiltré sur un système d'ultrafiltration tangentielle de 10 000 Da en utilisant une cassette 0,46 m<sup>2</sup> PTGC de la Société Millipore avec une pression d'entrée de 6,5 bars et une pression de sortie de 5,5 bars.

L'ultrafiltrat ainsi obtenu est récupéré et de nouveau ultrafiltré sur 500 Da en utilisant le dispositif commercialisé sous la marque Omega Centraset OM500DC05 par la Société Pall Filtron avec 1 bar en entrée de circuit et une pression nulle de sortie; cette nouvelle ultrafiltration vise à dessaler l'ultrafiltrat.

En vue de fractionner les oligomères, le rétentat

est de nouveau ultrafiltré sur 500 Da mais avec des pressions d'entrée de 2,5 bars et 2 bars à la sortie..

Le filtrat qui passe le seuil de coupure de 500 Da (environ 20 l) de la membrane est ensuite concentré sur évaporateur rotatif, neutralisé au carbonate d'ammonium puis lyophilisé en utilisant le dispositif commercialisé sous la marque Lyolab A LSL par la Société Secfroid. Le lyophilisat ainsi obtenu contient les oligofucanes appelés I27.

Les oligofucanes de la fraction I27 ainsi obtenus ont été soumis à un fractionnement supplémentaire par chromatographie d'échange d'ions et filtration de gel.

Le chromatogramme de filtration obtenu sur un gel de la marque BIOGEL P6 est reproduit sur le graphique de la figure 2 qui montre en abscisse le volume d'élution ( $V_e$ ) exprimé en ml et en ordonnées l'indice réfractométrique (RI) de l'éluat.

La structure des oligosaccharides ainsi obtenus (pics 1A à 4A du chromatogramme) a été analysée par RMN bidimensionnelle.

Il s'agit, dans le cas des pics 4A et 3A, respectivement d'un tétrasaccharide et d'un hexasaccharide formés par des résidus de fucose alternativement reliés par des liaisons  $\alpha(1 \rightarrow 3)$  et  $\alpha(1 \rightarrow 4)$  et sulfatés sur leur carbone 2 (figure 1).

Les pics 2A et 1A sont, quant à eux, constitués par des mélanges de DP variable d'oligosaccharides de la même série homologue, mais pouvant comporter des branchements.

Ce résultat suggère que les polysaccharides de départ sont constitués, au moins partiellement, par la répétition de motifs  $\alpha$ -L-Fuc-2-sulfate- $1 \rightarrow 3$ - $\alpha$ -L-Fuc-2-sulfate- $1 \rightarrow 4$  non décrits à ce jour.

Une deuxième méthode comporte une hydrolyse en continu; elle consiste, à l'aide d'une membrane d'ultrafiltration de 30 kDa, à soustraire à l'action de l'enzyme les oligofucanes à mesure de leur formation. La

fraction ainsi obtenue est désignée par "fraction I25" et contient des oligofucanes de masse moléculaire plus élevée que ceux constituant la fraction I27.

5 Du point de vue pratique, on dissout le substrat (50 g de FS28EtOH) dans 10 litres d'eau distillée.

Pour effectuer l'hydrolyse, on ajoute 25 ml d'enzyme sous forme d'une fraction précipitée au sulfate d'ammonium entre 40 et 60% de saturation, dans 2 litres de substrat; l'ultrafiltration en continu est engagée après 30 minutes.

10 Pour cette ultrafiltration, on utilise un appareil de marque Pellicon comportant une cassette de 30 000 Da, ledit appareil étant réglé sur 1 bar en entrée et 0 bar en sortie pendant toute la durée de l'hydrolyse.

15 La sortie du filtrat est partiellement fermée pour maintenir le débit de filtration à 2 l/h.

Les caractéristiques de l'enceinte réactionnelle sont choisies de façon à permettre un approvisionnement de l'enzyme en substrat jusqu'à épuisement des 10 litres et le maintien d'un volume fixe d'hydrolyse de 2 litres.

20 L'hydrolyse est poursuivie en ajoutant de l'eau distillée (8 litres) en continu jusqu'à ce que le filtrat ne contienne plus d'oligomères.

25 On obtient 18 litres d'un ultrafiltrat qui est concentré jusqu'à environ 1 litre à l'aide d'un appareil Pellicon équipé d'une cassette de 500 Da, la pression d'entrée étant de 2 bars et la pression de sortie de 0; une concentration supplémentaire jusqu'à 200 ml est effectuée par évaporation rotative, puis le concentrat est neutralisé et lyophilisé.

30 Le filtrat, qui contient les fractions de faible poids moléculaire (c'est-à-dire capable de passer sur une membrane au seuil de coupure de 500 Da) n'a pas été conservé.

35 La fraction I25 désigne les oligofucanes retenus entre les seuils de coupure de 500 Da et 30000 Da.

On a étudié l'activité biologique des fractions I27 et I25 sur les plantes.

L'effet éliciteur direct de ces fractions a été analysé sur des cultures de cellules de Tabac BY.

Cinq marqueurs des réactions de défense ont été testés indépendamment, à savoir:

- l'alcalinisation du milieu de culture (réponse précoce couramment observée lorsque les plantes sont incubées en présence d'éliciteurs oligosaccharidiques),

- les niveaux d'activité "phénylammonia lyase" (PAL) qui est une enzyme clé pour la synthèse des phytoalexines chez les plantes,

- les niveaux d'activité O-méthyl transférase (OMT) qui est une enzyme impliquée dans la synthèse de lignine,

- les niveaux d'activité lipoxygénase (LOX) qui est une enzyme impliquée dans la génération de jasmonate de méthyle, un élément des cascades de signalisation aboutissant à l'activation de gènes de défense et

- les teneurs en acide salicylique (SA) qui est un autre messenger secondaire impliqué dans les réactions de défense.

La fraction I27, administrée à une dose de 200 mg/l, induit une alcalinisation du milieu de culture des cellules de tabac de 1 à 1,5 unités pH. Par rapport aux cellules non traitées, les activités PAL et OMT sont stimulées respectivement d'un facteur 50 à 600 et 2,0 à 2,8, entre 4 heures et 8 heures après l'addition de I27 au milieu de culture.

L'activité LOX, mesurée 18 heures après l'addition de I27 à la dose de 200 mg/l est 7 fois plus importante que dans les cellules témoins. De même, 3 heures après le début du traitement, les teneurs en acide salicylique sont 70 fois plus importantes que dans les cellules non traitées.

Des résultats analogues ont été observés avec la fraction I25. On note toutefois une stimulation plus forte

de l'activité LOX, jusqu'à un facteur multiplicatif de 55 par rapport aux cellules témoins.

La figure 3 illustre l'influence de la fraction I25 sur la stimulation de l'activité PAL dans les cellules de tabac BY. Elle montre la variation de l'activité exprimée en p-co-katal par g (pkat/g) de masse fraîche de suspension cellulaire en fonction du temps exprimé en heures pour trois concentrations, à savoir 200 mg/l, 50 mg/l et 10 mg/l et pour un témoin.

10 L'examen de la figure 3 montre que des concentrations de 10 mg/l sont suffisantes pour déceler une stimulation significative par rapport aux cellules témoins non élicitées et on observe une saturation de la réponse pour les concentrations supérieures à 50 mg/l.

15 Les résultats de ces expériences montrent que les oligofucanes conformes à l'invention sont reconnus comme des éliciteurs par les cellules de tabac.

20 Par rapport à des cellules non traitées, ils stimulent très fortement (c'est-à-dire dans des proportions tout à fait comparables à celles d'autres éliciteurs comme les oligopectines et les oligo  $\beta$  1-3 glucanes), les activités PAL, LOX et OMT ainsi que les teneurs en SA.

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: Laboratoires GOËMAR S.A.
- (B) RUE: ZAC de la Madeleine
- (C) VILLE: SAINT MALO
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 35400
- (G) TELEPHONE: +33 2 99 21 53 70
- (G) TELEFAX: +33 2 99 8256 17
- (G) TELEX:

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Fuco-oligosaccharides, enzyme pour leur préparation à partir des fucanes, bactérie productrice de l'enzyme et applications des fuco-oligosaccharides à la protection des plantes.

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 4

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: disquette
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL:

## (v) DONNEES DE LA DEMANDE ACTUELLE:

NUMERO DE LA DEMANDE:  
DATE DE DEPOT: 21 septembre 1998

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1474 nucléotides
- (B) TYPE: séquence nucléotidique
- (C) NOMBRE DE BRINS: double brin
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: gènr de l'ARN 16S

(iii) HYPOTHETIQUE: non

(iv) ANTI-SENS: non

## (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: CNRS, Station Biologique, Laboratoire de Biologie cellulaire et moléculaire des algues, 29682 Roscoff Cedex
- (B) SOUCHE: SW5

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGAGTTTGTAT	CNTGGCTCAG	GATGAACGCT	AGCGGCAGGC	CTAACACATG	CAAGTCGAGG	060
GGTAGAGAGA	GCTTGCTTTT	CTTGAGACCG	GCGCACGGGT	GCGTAACGCG	TATACAATCT	120
GCCTCTTACT	GCGGGATAGC	CCAGAGAAAT	TTGGATTAAT	ATCGCATAGC	ATAACGACCC	180
CGCATGGGAT	GTTATTAAAG	GTTACGGTAA	GAGATGAGTA	TGCGTCTTAT	TAGCTAGATG	240
GAGTGGTAAC	GGCACACCAT	GGCAACGATA	GATAGGGGCC	CTGAGAGGGG	GATCCCCCAC	300
ACTGGTACTG	AGACACGGAC	CAGACTCCTA	CGGGAGGCAG	CAGTGAGGAA	TATTGGACAA	360
TGGAGGCAAC	TCTGATCCAG	CCATGCCGCG	TGCAGGAAGA	CGGCCCTATG	GGTTGTAAAC	420
TGCTTTTATA	CGGGAAGAAA	CACCGCTACG	TGTAGCCTTT	GACGGTACCG	TAAGAATAAG	480
GATCGGCTAA	CTCCGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGGAG	GATCCAAGCG	TTATCCGGAA	540
TCATTGGGTT	TAAAGGGTCC	GTAGTGGATG	ATTAAGTCAG	AGGTGAAATC	CTGCCGCTCA	600
ACGGTAGAAT	TGCCTTTGTAT	ACTGGTTATC	TTGAATCAAT	GTGAAGTGGT	TAGAATTAGT	660
AGTGTAGCGG	TGAAATGCAT	AGATATTACA	TAGAATACCA	ATTGCGAAGG	CAGATCACTA	720
ACATTGTATT	GACACTGATG	GACGAAAGCG	TGGGGAGCGA	ACAGGATTAG	ATACCCCTGGT	780
AGTCCACGCC	GTAAACGATG	GATACTAGCT	GTTCGGATTT	ATCTGAGTGG	CTAAGCGAAA	840
GTGATAAGTA	TCCCACCTGG	GGAGTACGTT	CGCAAGAATG	AAACTCAAAG	GAATTGACGG	900
GGGCCCCGCAC	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	TAATTCGATG	ATACGCGAGG	AACCTTACCA	960
GGGCTTAAAT	GTAGATTGCA	TTAGGTGGAG	ACACTTATTT	CTTCGGACCA	TCTACAAGGT	1020
GCTGCATGGT	TGTCGTCAGC	TCGTGCCGTG	AGGTGTCAGG	TTAAGTCCTA	TAACGAGCGC	1080
AACCCCCGTT	GTTAGTTGCC	AGCGAGTCAT	GTCGGGAACT	CTANCAAGAC	TGCCAGTGCA	1140
AACTGTGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAA	TCATCACGGC	CCTTACGTCC	TGGGCTACAC	1200
ACGTGCTACA	ATGGTAGGGA	CAGAGAGCAG	CCACTGGGCG	ACCAGGACCG	AATCTATAAA	1260
CCCTATCACA	GTTCGGATCG	GAGTCTGACA	CTCGACTCCG	TGAAGCTGGA	ATCCGTAGTA	1320
ATCGCATATC	AGCCATGATG	CGGTGAATAA	GTTCCCGGGC	CTTGTAACACA	CCGCCCCGTCA	1380
AGCCATGGAA	GCTGGGAGTG	CCTGAAGTCC	GTCACCGCAA	GGAGCGGCCT	AGGGTAAAAAT	1440
CGGTAAC TAG	GGCTAAGTCG	TAACAAGGTG	TCCG			1474

(3) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 15 acides aminés  
(B) TYPE: séquence peptidique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple brin  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(iii) HYPOTHETIQUE: non

(iv) ANTI-SENS: non

(vi) ORIGIN:

- (A) ORGANISME: CNRS, Station biologique, Laboratoire de  
biologie cellulaire et moléculaire des algues, 29682  
Roscoff Cedex
- (B) SOUCHE: SWS

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Gln Thr Ala Asn Thr Thr Tyr Gly Ile Asn Thr Val Ala Ser Met  
5 10 15

## (4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 acides aminés
- (B) TYPE: séquence peptidique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple brin
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

Thr Ser Gly Pro Asp Trp Leu Thr Ile Gln Gln Thr Asp Ala Asn Ser  
                                   5                                  10                                  15  
 Gly Lys

## (5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 17 acides aminés
- (B) TYPE: séquence peptidique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple brin
- (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Ile Thr Val Asp His Val Ala Gly Phe Thr Asn Leu Trp Asn Gly Ala  
                                   5                                  10                                  15  
 Pro



REVENDICATIONS

- 5 1. Fuco-oligosaccharides sulfatés dont le degré de polymérisation est de 4 à 100, de préférence de 4 à 20 unités  $\alpha$ -L fucose.
2. Fuco-oligosaccharides répondant aux formules (I) et (II) représentées à la figure 1.
3. Souche bactérienne en bâtonnet Gram négatif déposée sous le N° 12171 dans la Collection DSMZ.
- 10 4. Endofucanase susceptible d'être obtenue à partir de la souche bactérienne selon la revendication 3.
5. Gène(s) d'endofucanase caractérisés par le fait qu'il(s) cod(ent) pour des protéines contenant les microséquences ID No. 2, ID No. 3 et ID No. 4.
- 15 6. Procédé de préparation des fuco-oligosaccharides selon les revendications 1 et 2, caractérisé par le fait qu'il comporte une étape d'hydrolyse enzymatique mettant en oeuvre l'endofucanase selon la revendication 4.
7. Fuco-oligosaccharides susceptibles d'être obtenus par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 6.
- 20 8. Composition phytopharmaceutique pour la protection des plantes comprenant une quantité efficace de fuco-oligosaccharides selon l'une des revendications 1, 2 et 7.
9. Utilisation pour un traitement de protection des plantes, des fuco-oligosaccharides selon l'une des revendications 1, 2 ou 7.
- 25

l'aide de l'enzyme produite par la bactérie SW5 montrent que l'activité enzymatique de la souche en question est de type endolytique; il a été remarqué au cours des essais que les fucanes présentent des éléments de structure semblables  
5 quelle que soit l'algue brune dont ils sont extraits.

L'activité endo-fucanase de la souche SW5 a été purifiée à l'homogénéité électrophorétique; on a déterminé que la protéine en question a une masse moléculaire d'environ 105 kDa.

10 Trois peptides internes ont alors été micro-séquencés.

On a ainsi obtenu les microséquences ID No.2, ID No.3 et ID No.4.

15 L'invention vise également les gènes d'endofucanase caractérisés par le fait qu'ils codent pour des protéines contenant les microséquences ID No.2, ID No. 3 et ID No. 4.

La purification de l'activité endo-fucanase dont il a été question plus haut, a été effectuée à l'aide d'un système commercialisé sous l'appellation FPLC® par la  
20 Société Pharmacia; ce système a été placé à 4°C.

Après cinq jours de culture de la souche SW5 dans  
6 1 de milieu Zobell-Fucane, on procède à une micro-filtration sur un dispositif du type Pellicon de la Société Millipore équipé d'une cassette de 0,45 µm (Millipore) puis  
25 à une ultrafiltration sur une cassette PTGC de 30 000 Da.

Pour le fractionnement des protéines, on procède de la façon suivante:

Pour le premier fractionnement de 0 à 40%, on ajoute à la solution protéique du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 242 g/l petit à petit  
30 et sous agitation lente à 4°C. Lorsque tout le sulfate d'ammonium est dissous, la solution est centrifugée; le culot, qui représente la fraction entre 0 et 40% n'est pas conservé tandis que le surnageant est soumis à un nouveau fractionnement de 40 à 60%. Ce fractionnement est réalisé  
35 par addition de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à 130 g/l petit à petit et sous agitation lente à 4°C. Lorsque tout le solide est dissous, la solution est centrifugée; le culot, qui représente la fraction protéique entre 40 et 60% de saturation du sulfate

REVENDICATIONS

1. Fuco-oligosaccharides sulfatés dont le degré de polymérisation est de 4 à 100, de préférence de 4 à 20 unités  $\alpha$ -L fucose.

2. Fuco-oligosaccharides répondant aux formules (I) et (II) représentées à la figure 1.

3. Procédé de préparation des fuco-oligosaccharides selon les revendications 1 et 2, caractérisé par le fait qu'il comporte une étape d'hydrolyse enzymatique mettant en oeuvre une endofucanase susceptible d'être obtenue à partir de la souche bactérienne en bâtonnet Gram négatif déposée sous le N° 12171 dans la Collection DSMZ.

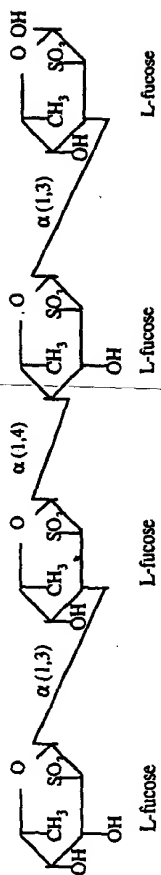
4. Fuco-oligosaccharides susceptibles d'être obtenus par mise en oeuvre du procédé selon la revendication 3.

5. Composition phytopharmaceutique pour la protection des plantes comprenant une quantité efficace de fuco-oligosaccharides selon l'une des revendications 1, 2 et 4.

6. Utilisation pour un traitement de protection des plantes, des fuco-oligosaccharides selon l'une des revendications 1, 2 ou 4.

FIG. 1

I



II

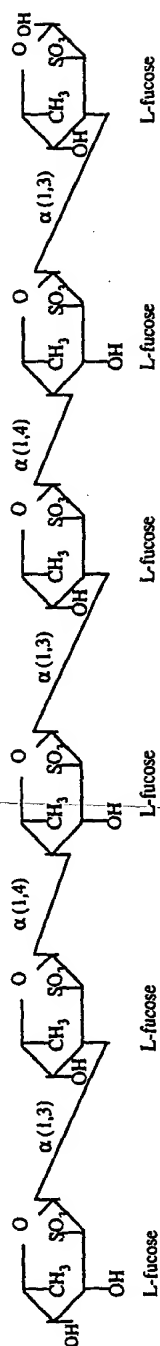


FIG. 2

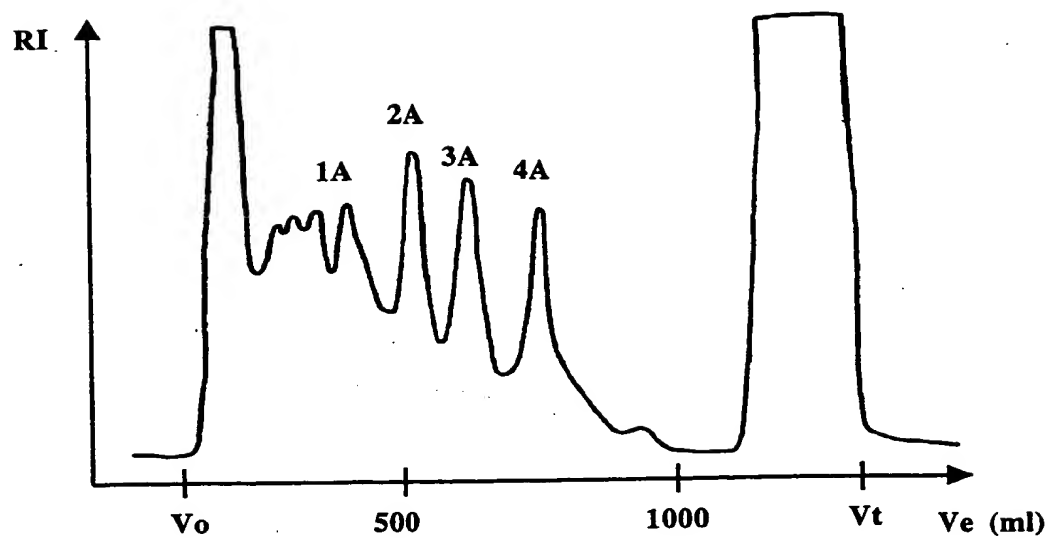
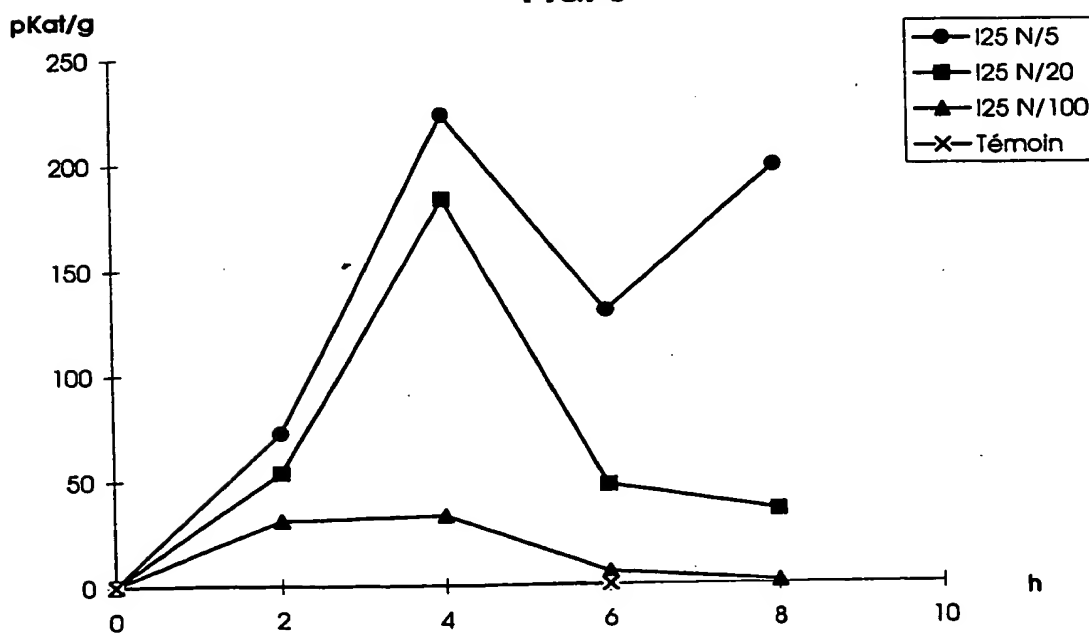


FIG. 3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---